



Europäisches  
Patentamt

European  
Patent Office

Office européen  
des brevets

EP 99 / 3291

REC'D 26 JUL 1999

WIPO PCT

09/07/99

Bescheinigung

Certificate

Attestation

Die angehefteten Unterlagen stimmen mit der ursprünglich eingereichten Fassung der auf dem nächsten Blatt bezeichneten europäischen Patentanmeldung überein.

The attached documents are exact copies of the European patent application described on the following page, as originally filed.

Les documents fixés à cette attestation sont conformes à la version initialement déposée de la demande de brevet européen spécifiée à la page suivante.

Patentanmeldung Nr. Patent application No. Demande de brevet n°

98108726.5

## PRIORITY DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Der Präsident des Europäischen Patentamts:  
Im Auftrag

For the President of the European Patent Office

Le Président de l'Office européen des brevets  
p.o.

D. DIEBER

DEN HAAG, DEN  
THE HAGUE,  
LA HAYE, LE

13/07/99



Europäisches  
Patentamt

European  
Patent Office

Office européen  
des brevets

**Blatt 2 der Bescheinigung**  
**Sheet 2 of the certificate**  
**Page 2 de l'attestation**

Anmeldung Nr.  
Application no.  
Demande n° 98108726.5

Anmeldetag  
Date of filing  
Date de dépôt 13/05/98

Anmelder  
Applicant(s)  
Demandeur(s)  
Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. Berlin  
80539 München  
GERMANY

Bezeichnung der Erfindung  
Title of the invention  
Titre de l'invention

Verfahren zur Erzeugung von Pflanzen mit erhöhter Toleranz gegen Trockenheit und/oder Pilzbefall  
und/oder erhöhte Salzkonzentrationen durch die Expression plasmodesmen-lokalisierter Proteine

In Anspruch genommene Priorität(en) / Priority(ies) claimed / Priorité(s) revendiquée(s)

Staat  
State  
Pays

Tag  
Date  
Date

Aktenzeichen  
File no  
Numéro de dépôt

Internationale Patentklassifikation  
International Patent classification  
Classification internationale des brevets

/

Am Anmeldetag benannte Vertragsstaaten  
Contracting states designated at date of filing AT/BE/CH/CY/DE/DK/ES/FI/FR/GB/GR/IE/IT/LI/LU/MC/NL/PT/SE  
Etats contractants désignés lors du dépôt

Bemerkungen  
Remarks  
Remarques

Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V.  
Berlin, Deutschland  
U.Z.: B 2729 EP

**Verfahren zur Erzeugung von Pflanzen mit erhöhter Toleranz gegen  
Trockenheit und/oder Pilzbefall und/oder erhöhte Salzkonzentrationen durch  
die Expression plasmodesmen-lokalisierter Proteine**

Die Erfindung betrifft die Verwendung von Nukleinsäuren, die ein (Poly)peptid mit einer intrinsischen Affinität zu Plasmodesmen kodieren, zur Erzeugung von Pflanzen oder Teilen davon mit erhöhter Toleranz gegen Trockenheit und/oder Pilzinfektionen und/oder erhöhten Salzkonzentrationen sowie entsprechende Verfahren. Vorteilhafterweise transfiguriert man dabei eine Pflanze, ein Pflanzengewebe oder eine Pflanzenzelle mit der Nukleinsäure. Vorzugsweise kodiert die Nukleinsäure ein Virus-kodiertes Transportprotein, das in einer besonders bevorzugten Ausführungsform ein Derivat des pr17-Proteins mit einer hydrophilen N-terminalen Verlängerung ist.

Ein Ziel der klassischen Pflanzenzüchtung ist die Schaffung von ertragreichen Sorten, die eine erhöhte Toleranz gegenüber Umweltfaktoren aufweisen bzw. gegenüber Streßfaktoren resistent sind. Diese Streßfaktoren können sowohl biotischer (Insekten, Viren, Pilze etc.) als auch abiotischer Natur sein (extreme Temperaturen, Salz, Trockenheit). Während Wildpflanzen an streßdominierten Standorten sich an die extremen Lebensbedingungen adaptiert haben, beschränken Dürre, Hitze oder Salinität des Bodens die Möglichkeiten zum Anbau von Kulturpflanzen in solchen Gebieten. Andererseits erleidet die Landwirtschaft auch an anderen Standorten große Einbußen durch abiotischen Streß, wie das Beispiel des Dürrejahres 1983 in den USA gezeigt hat: Nahezu die Hälfte der gesamten Maisernte und ein Drittel des erwarteten Sojaertrags wurden durch die anhaltende Trockenheit vernichtet.

Allen genannten abiotischen Streßbedingungen ist gemein, daß sie das intrazelluläre Wassergleichgewicht stören. Pflanzen können sich jedoch in gewissen Grenzen auf Streßbedingungen einstellen (Bohnert, H.J., Nelson, D.E. und Jensen, R.G. (1995).

Adaptations to environmental stress. *Plant Cell* 7: 1099-1011). So sind z.B. Proteine sowie Metaboliten des pflanzlichen Stoffwechsels wie Zuckeralkohole, Prolin oder Glyzinbetain als in der Folge von abiotischem Streß akkumulierende Osmoregulatoren identifiziert worden. Darauf basierend wurden verschiedene Strategien entwickelt, durch gentechnologische Veränderungen transgene Pflanzen mit erhöhter Toleranz gegenüber derartigen Faktoren bzw. erhöhter Streßresistenz zu erzeugen (Übersichtsartikel von Holmberg, N. und Bülow, L. (1998). Improving stress tolerance in plants by gene transfer. *Trends-Plant Science* 3: 61-66). Ein Beispiel für pflanzliche Proteine als Antistreß-Faktoren sind die sogenannten LEA (late embryogenesis abundant)-Proteine, deren erhöhte Expression mit physiologischem und Umweltstreß korreliert und die eine Schutzfunktion für die Pflanze unter extremen Streßbedingungen darstellen (siehe z.B. Chandler, P.M. und Robertson, M. (1994). Gene expression regulated by abscisic acid and its relation to stress tolerance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 45: 113-141). Die gentechnische Veränderung von Reis mit Hilfe des Gersten-LEA-Gens HVA1 resultierte tatsächlich in einer erhöhten Toleranz gegenüber Trockenheit und Salz (Xu, D., Duan, X., Wang, B., Hong, B., Ho, T.-H.D. und Wu, R. (1996). Expression of a late embryogenesis abundant gene, HVA1 from barley, confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice. *Plant Physiology* 110: 249-257). Andere Arbeiten zur Expression eines LEA-Gens in einem heterologen System konnten diese Befunde nicht unterstützen (Iturriaga, G., Schneider, K., Salamini, F. und Bartels, D. (1992). Expression of desiccation-related proteins from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* in transgenic tobacco. *Plant Mol. Biol.* 20: 555-558).

---

Unter den als Antistreßfaktoren oder Osmoprotektoren identifizierten pflanzlichen Metaboliten befindet sich das Glyzinbetain, dessen Wirksamkeit z.B. im Mais nachgewiesen wurde (Saneoka, H., Nagasaka, C., Hahn, D.T., Yang, W.-J., Premachandra, G.S., Joly, R.J. und Rhodes, D. (1995). Salt tolerance of glycinebetaine-deficient and -containing maize lines. *Plant Physiol.* 107: 631-638). An der Synthese des Glyzinbetains in pflanzlichen Chloroplasten ist die Betinaldehyd-Dehydrogenase (BADH) beteiligt (Rhodes, D. und Hanson, A.D.

(1993). Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **44**: 357-384). Transgene Tabakpflanzen, welche eine bakterielle BADH (Holmstrom, K.-O., Welin, B., Mandal, A., Kristiansdottir, I., Teeri, T.H., Trond, L., Strom, A.R. und Palva, E.T. (1994). Production of the *Escherichia coli* betaine-aldehyde dehydrogenase, an enzyme required for the synthesis of the osmoprotectant glycine betaine, in transgenic plants. *Plant. J.* **6**: 749-758) oder eine pflanzliche BADH exprimieren (Rathinasabapathi, B., McCue, K.F., Gage, D.A. und Hanson, A.D. (1994). Metabolic engineering of glycine betaine synthesis: plant betaine aldehyde dehydrogenase lacking typical transit peptides are targeted to tobacco chloroplasts where they confer betaine aldehyde resistance. *Planta* **193**: 155-162), zeigten die erwartete Resistenz gegen Betinaldehyd durch Konversion zu Glyzinbetain in Mengen, die in gestreßten Pflanzen gemessen werden. Über eine erhöhte Streßtoleranz dieser Pflanzen wurde jedoch nicht berichtet.

Zuckerderivate wie Zuckeralkohole oder Fruktane werden offensichtlich ebenfalls bei der Streßantwort der Pflanze in erhöhtem Maße gebildet und akkumuliert. Die Erhöhung des Mannitol-Spiegels in transgenen Tabakpflanzen durch Expression einer bakteriellen Mannitol-1-phosphate-Dehydrogenase bewirkte eine erhöhte Salztoleranz (Tarczynski, M.C., Jensen, R.G. und Bohnert, H.J. (1993). Stress protection of transgenic tobacco by production of the osmolyte mannitol. *Science* **259**: 508-510). Gleichmaßen zeigten transgene Tabakpflanzen mit erhöhtem Fruktangehalt im Vergleich mit Kontrollpflanzen eine erhöhte Widerstandsfähigkeit gegen Trockenheit (Pilon-Smith, E.A.H., Ebskamp, M.J.M., Paul, M.J., Jeuken, M.J.W., Weisbeek, P.J. und Smeekens, S.C.M. (1995). Improved performance of transgenic fructan-accumulating tobacco under drought stress. *Plant Physiol.* **107**: 125-130).

Allen diesen bisher genannten gentechnologischen Verfahren ist gemein, daß sie eine erhöhte Synthese von Osmoprotektoren in der Pflanze zur Folge haben, wodurch z.B. das normale Wachstum der Pflanze beeinträchtigt werden kann (siehe Rathinasabapathi et al., op. cit.). In anderen Fällen werden bakterielle Gene in der

Pflanze exprimiert, was nicht notwendigerweise mit einer optimalen Expression und damit einer suboptimalen Streßbewältigung einhergeht. Die der vorliegenden Erfindung zugrunde liegende Aufgabe war somit, ein Verfahren bereitzustellen, Pflanzen mit gesteigerter Streßresistenz bereitzustellen, die dennoch ein im wesentlichen normales Wachstum aufweisen. Vorzugsweise sollte diese Streßresistenz (oder Toleranz) sich auf biotische wie auch abiotische Streßfaktoren beziehen. Diese Aufgabe wird durch die in den Ansprüchen gekennzeichneten Ausführungsformen gelöst.

Die Erfindung betrifft somit die Verwendung einer Nukleinsäure, die ein (Poly)peptid mit einer intrinsischen Affinität zu Plasmodesmen kodiert zur Erzeugung von Pflanzen oder Teilen davon mit erhöhter Toleranz gegen Trockenheit und/oder Pilzinfektionen und/oder erhöhten Salzkonzentrationen. Üblicherweise wird erfindungsgemäß eine Pflanze, ein Pflanzengewebe oder eine Pflanzenzelle mit einer derartigen Nukleinsäure nach konventionellen Verfahren transfiziert.

Alle höheren Pflanzen zeichnen sich dadurch aus, daß sie zur Photosynthese von Zuckern und deren Derivaten befähigt sind, die wie oben erwähnt als Osmoprotektoren unter Streßbedingungen dienen können. Die intrazelluläre Konzentration der Zucker und Zuckerderivate - vor allem in den Blättern zum Schutz der Photosynthese-aktiven Chloroplasten - wurde erfindungsgemäß in überraschend einfacher Weise durch die vorstehend gekennzeichnete Maßnahme gelöst. Von besonderem Vorteil neben der Tatsache, daß diese Maßnahme für den Fachmann in einfacher Weise zu bewerkstelligen ist, ist ferner, daß erfindungsgemäß die Streßresistenz mit einem in vielen und möglicherweise sogar allen Pflanzen gültigen Mechanismus erhöht werden kann. Überraschenderweise konnte mit dem erfindungsgemäßen Verfahren die pflanzliche Toleranz sowohl gegenüber abiotischen wie auch gegenüber biotischen Faktoren erhöht werden.

Der Begriff "erhöhte Salzkonzentration" bezieht sich auf Salzkonzentrationen im Boden, die zu einer erhöhten Ionenkonzentration in der Pflanze führen, die dann zu vermindertem Wachstum führt. Die absoluten Salzkonzentrationen im Boden, die als erhöht anzusehen sind, sind für unterschiedliche Pflanzen verschieden, können vom

Fachmann aber nach konventionellen Verfahren bestimmt werden, z.B. anhand des Offenbarungsgehaltes von Greenway und Munns (1980). Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. Ann. Rev. Plant Physiol. **31**: 149-190.

In einer bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verwendung wird ferner eine Pflanze aus der transfizierten Pflanzenzelle regeneriert.

Die Regeneration der Pflanzen kann nach üblichen und dem Fachmann geläufigen Verfahren erfolgen.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verwendung werden im Anschluß an den Regenerationsschritt ferner weitere Pflanzen oder Pflanzenzellen aus der regenerierten Pflanze erzeugt.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verwendung ist das (Poly)peptid ein Virus-kodiertes Transportprotein.

Die Expression von pflanzenviralen Proteinen, die am Transport viraler Information von Zelle zu Zelle beteiligt sind (Transportproteine), beeinflussen auch den Transport bzw. Metabolismus von Stärke, Zuckern und Zuckerderivaten derart, daß sie während der Lichtperiode in den Photosynthese-aktiven Blättern der Pflanze zu höheren als normalen Werten akkumulieren (vgl. z.B. Lucas u.a. (1993). Influence of the tobacco mosaic virus 30-kDa movement protein on carbon metabolism and photosynthate partitioning in transgenic tobacco plants. Planta **190**: 88-96; Olesinski u.a. (1995). Pleiotropic effects of tobacco-mosaic-virus movement protein on carbon metabolism in transgenic tobacco plants. Planta **197**: 118-126; Olesinski u.a.

(1996). Tissue-specific expression of the tobacco mosaic virus movement protein in transgenic potato plants alters plasmodesmal function and carbohydrate partitioning. Plant Physiol. **111**: 541-550; Herbers u.a. (1997). Expression of a luteoviral movement protein in transgenic plants leads to carbohydrate accumulation and reduced photosynthetic capacity in source leaves. Plant J. **12**: 1045-1056; Almon u.a. (1997). Phloem-specific expression of the tobacco mosaic virus movement protein alters carbon metabolism and partitioning in transgenic potato plants. Plant Physiol. **115**: 1599-1607). Die Erhöhung der pflanzlichen Toleranz gegenüber den

vorstehend genannten Umweltfaktoren durch die Expression derartiger Proteine mit einer intrinsischen Affinität zu Plasmodesmen, den Verbindungskanälen benachbarter Zellen in Pflanzen gemäß dieser bevorzugten Ausführungsform der Erfindung war aus dem Stand der Technik nicht ohne weiteres abzuleiten. Die eigentliche Funktion von virus-kodierten Transportproteinen (TP) besteht nämlich darin, den Transport der genetischen Information eines Virus von Zelle zu Zelle zu gewährleisten und so die Ausbreitung eines Virus vom ursprünglichen Infektionsort in die gesamte Pflanze zu ermöglichen.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verwendung ist das Virus-kodierte Transportprotein das Kartoffelblattrollvirus-(PLRV) Transportprotein pr17 oder ein Derivat davon.

Wie in den Beispielen erläutert wurden das TP des Kartoffel-Blattrollvirus (potato leafroll virus, PLRV) sowie die Kulturpflanze Kartoffel als Modellsystem gewählt. Das PLRV-TP, das ein Merkmal einer besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens darstellt, ist ein 17 kDa großes Protein (pr17), das für den Transfer der genomischen RNA von Zelle zu Zelle verantwortlich ist. Es wird durch das offene Leseraster (ORF) ORF4 kodiert; dieses Gen ist innerhalb des ORF3, des Gens für das virale Kapsidprotein CP, gelegen, jedoch in einem anderen Leseraster. Das Protein besitzt eine aminoterminal Domäne zur Bildung von Homopolymeren (Tacke, E., Prüfer, D., Schmitz, J. und Rohde, W. (1993). Mutational analysis of the nucleic acid-binding 17K protein of potato leafroll luteovirus identifies an amphipathic  $\alpha$ -helix as the domain for protein/protein interactions. *Virology* **197**: 274-282.) und eine carboxyterminale Domäne zur Bindung einzelsträngiger Nukleinsäuren (Tacke, E., Prüfer, D., Schmitz, J. and Rohde, W. (1991): The potato leafroll luteovirus 17 kDa protein is a single-stranded nucleic acid-binding protein. *J. Gen. Virol.* **72**: 2035-2038). Dieses Protein, das *in planta* phosphoryliert vorliegt (Tacke *et al.*, 1993, op. cit.; Sokolova, M., Prüfer, D., Tacke, E. und Rohde, W. (1997). The potato leafroll virus 17K movement protein is phosphorylated by a membrane-associated protein kinase from potato with biochemical features of protein kinase C. *FEBS Lett.* **400**: 201-205), wird siebenfach stärker exprimiert als das virale Hüllproteingen (Tacke, E., Prüfer, D., F. Salamini



und Rohde, W. (1990). Characterization of a potato leafroll luteovirus subgenomic RNA: Differential expression of viral proteins by internal translation initiation and UAG suppression. *J. Gen. Virol.* **71**: 2265-2272). In PLRV-infizierten sowie in pr17-transgenen Kartoffelpflanzen ist das pr17 vorwiegend an den Plasmodesmen zwischen Siebelement und Geleitzelle des Phloems lokalisiert (Schmitz, J., Stussi-Garaud, C., Tacke, E., Prüfer, D., Rohde, W. und Rohfritsch, O. (1997). *In situ* localization of the putative movement protein (pr17) from potato leafroll luteovirus (PLRV) in infected and transgenic potato plants. *Virology* **235**: 311-322), auf das sich das Virus während seiner Vermehrung in der Pflanze beschränkt. Expression eines mutierten pr17-Proteins in transgenen Kartoffelpflanzen bewirkt Breitbandresistenz gegen die wichtigsten Kartoffelviren (Tacke, E., Salamini, F. und Rohde, W. (1996). Genetic engineering of potato for broad-spectrum protection against virus infection. *Nature Biotechnology* **14**: 1597-1601). Zugleich wurde jedoch im Zuge dieser Erfindung beobachtet, daß die Expression von WT und mutierten PLRV-TPs in transgenen Kartoffel- und Tabakpflanzen zu einem Anstieg der intrazellulären Konzentrationen von Zuckern (Sucrose, Fruktose, Glucose) und Zuckerderivaten wie Stärke führt.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verwendung ist das Derivat ein pr17-Protein mit einer hydrophilen N-terminalen Verlängerung.

Besonders gute Ergebnisse im Sinne dieser Erfindung wurden gefunden, wenn eine Variante des pr17-Gens verwendet wurde, die eine N-terminale Verlängerung trägt (pr17-N). In einem Ausführungsbeispiel wurde zum 5'-Ende des pr17-WT-Gens der

Polylinker (multiple cloning site; MCS) des Bluescript-Vektors translational fusioniert und durch gezielte Mutagenese sowohl die beiden ersten AUG-Translationskodons von pr17 in ACG-Kodons mutiert und ein AUG-Translationsstartkodon in die Polylinkersequenz eingeführt (Figur 1). Diese Veränderung resultiert in der Expression eines Derivates (pr17-N) des pr17-WT-Proteins mit einer hydrophilen Verlängerung durch die Sequenz MAELGSGSELHRGGGRSRTS am Aminoterminal (Tacke u.a., 1996, op. cit.; Figur 2). Solche transgenen Kartoffelpflanzen zeigen im

Gewächshaus-Test Breitbandresistenz gegen die Kartoffelviren PLRV, PVY und PVX sowie eine erhöhte Konzentration an Zuckern und Zuckerderivaten.

Zur Expression in Pflanzen wurde dieses Gen unter die transkriptionelle Kontrolle des 35S-Promotors und -Terminators des Blumenkohlmosaikvirus (CaMV) im Vektor pRT103 gebracht (Töpfer u.a. (1987). A set of plant expression vectors for transcriptional and translational fusions. *Nucleic Acids Res.* **15**: 5890) und diese Transkriptionseinheit (Figur 1) anschließend in den binären Pflanzen-transformationsvektor pBIN19 integriert (Bevan, M. (1984). Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Res.* **12**: 8711-8721). Dieser Vektor wurde in den *Agrobacterium tumefaciens*-Stamm LBA4404 (pAL4404) übertragen (Hoekema u.a. (1983). A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature* **303**: 179-180), der zur Transformation von *Solanum tuberosum* Var. Linda eingesetzt wurde. Vier (L4, L6, L7 und L8; siehe auch Tacke *et al.*, 1996, op. cit.) der unabhängigen transgenen Kartoffellinien sowie die Ausgangskartoffelsorte Linda wurden für die weiteren Versuche zur induzierten Toleranz ausgewählt.

Wie bereits vorstehend erwähnt, umfaßt in einer besonders bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verwendung die hydrophile Verlängerung die Aminosäuresequenz MAELGSGSELHRGGGRSRTS.

In einer anderen Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verwendung stammen die Pflanze, das Pflanzengewebe oder die Pflanzenzellen aus der Kartoffel, aus Tabak, aus Getreide oder Gemüse bzw. sind Kartoffeln, Tabakpflanzen, Getreidepflanzen oder Gemüsepflanzen.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verwendung ist die Erhöhung der Toleranz der Pflanzen gegen Pilzinfektionen eine der Toleranz gegen Infektionen mit *Phytophthora infestans*.

Als ein überraschender Befund gemäß dieser bevorzugten Ausführungsform wurde gefunden, daß mit dem erfindungsgemäßen Verfahren erhaltene transgene Linien

sich auch durch eine statistisch signifikante Toleranz gegen *Phytophthora infestans*, den Erreger der Kraut- und Knollenfäule, auszeichnen.

Die Erfindung betrifft ferner Verfahren zur Erzeugung von Pflanzen oder Teilen davon mit erhöhter Toleranz gegen Trockenheit und/oder Pilzinfektionen und/oder erhöhte Salzkonzentrationen, wobei man

- (a) eine Pflanze, ein Pflanzengewebe oder eine Pflanzenzelle mit einer Nukleinsäure transfiziert, die ein (Poly)peptid mit einer intrinsischen Affinität zu Plasmodesmen kodiert.

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird ferner

- (b) eine Pflanze aus der transfizierten Pflanzenzelle regeneriert.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens erzeugt man

- (c) im Anschluß an Schritt (b), ferner weitere Pflanzen oder Pflanzenzellen aus der in (b) gewonnenen Pflanze.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist das (Poly)peptid ein Virus-kodiertes Transportprotein.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist das Virus-kodierte Transportprotein das Kartoffelblattrollvirus-(PLRV)

---

Transportprotein pr17 oder ein Derivat davon.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist das Derivat ein pr17-Protein mit einer hydrophilen N-terminalen Verlängerung.

Wie bereits vorstehend erwähnt, umfaßt in einer besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens die hydrophile Verlängerung die Aminosäuresequenz MAELGSGSELHRGGGRSRTS.

In einer anderen Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens stammen die Pflanze, das Pflanzengewebe oder die Pflanzenzellen aus der Kartoffel, aus Tabak, aus Getreide oder Gemüse bzw. sind Kartoffeln, Tabakpflanzen, Getreidepflanzen bzw. Gemüsepflanzen.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist die Erhöhung der Toleranz der Pflanzen gegen Pilzinfektionen eine der Toleranz gegen Infektionen mit *Phytophthora infestans*.

Die Figuren zeigen:

#### **Figur 1**

Herstellung des Plasmids p17N. Durch spezifische Mutagenese wurden die beiden AUG-Kodons des Wildtyp pr17-Gens in ACG mutiert und ein Translations-Initiationskodon in die Polylinkersequenz eingeführt.

#### **Figur 2**

Nukleotid und Aminosäuresequenz des mutierten pr17N-Gens bzw. -Proteins.

#### **Figur 3**

Ergebnis des Resistenztests #1 (im Gewächshaus) mit je 5 Pflanzen der Ausgangssorte Linda (L) sowie der pr17N-transgenen Linien L4, L6, L7 und L8.

A. Gesamtansicht des Versuchs. B. Ansicht je einer Pflanze pro Linie.

---

#### **Figur 4**

Ergebnis des Resistenztests #2 (in der Phytokammer) mit je 6 Pflanzen der Ausgangssorte Linda (L) sowie der pr17N-transgenen Linien L4, L6, L7 und L8.

A. Teilansicht des Gesamtversuchs. B. Ansicht ausgewählter Pflanzen

**Figur 5**

Bonitur des Befalls von Blattscheiben im Labortest mit *P. infestans* Rasse 1-11 (Versuch #2) nach 9, 10 und 13 Tagen nach der Infektion (dpi).

**Figur 6**

Kumulative Darstellung zweier Versuche der Infektion von Kartoffel-Blattscheiben mit *P. infestans* Rasse 1-11.

Die Beispiele erläutern die Erfindung.

**Beispiel 1: Herstellung des Plasmids p17N**

Eine Modifikation am 5'-Ende des pr17-Gens (ORF4) wurde durch translationale Fusion der multiple cloning site des Bluescript-Vektors, Einführung eines optimierten Translationsinitiationskodons sowie Mutation der beiden pr17-WT AUG-Initiationskodons zu ACG erreicht (Figur 1). Diese Veränderung resultiert in der Expression eines Derivates (pr17-N) des pr17-WT-Proteins mit einer hydrophilen Verlängerung durch die Sequenz MAELGSGSELHRGGGRSRTS am Aminoterminus (Tacke *et al.*, 1996, op. cit.; Figur 2). Die Herstellung des Plasmids p17N ist beschrieben in Schmitz, J., Prüfer, D., Rohde, W. und Tacke, E. (1996). Non-canonical translation mechanisms in plants: Efficient *in vitro* and *in planta* initiation at AUU codons of the tobacco mosaic virus enhancer sequence. *Nucleic Acids Res.* 24: 257-263 (dort bezeichnet als p17/NIII).

**Beispiel 2: Einführung der T-DNA in den Empfängerorganismus**

Nach Transformation von *E. coli* S17-1 Zellen und Mating mit dem *A. tumefaciens* Stamm LBA 4404 (pAL 4404) (Hoekema *et al.*, 1983) wurden Agrobakterien, die das Plasmid p17N trugen, zur Pflanzentransformation eingesetzt. Blätter von *S. tuberosum* var. Linda aus der Sterilkultur wurden an der Basis abgeschnitten und 10 min in flüssigem MS-Medium mit einer über Nacht gewachsenen Agrobakterien-Kultur inkubiert. Nach zweitägiger Inkubation auf festem MS-Medium wurden die

Blätter abgewaschen und auf Selektions-, Regenerationsmedium ausgelegt. Dieses bestand aus MS-Medium komplementiert mit 0,02 mg/l Naphtylelessigsäure, 0,02 mg/l Giberellinsäure, 2 mg/l Zeatinribosid, 500 mg/l Claforan und 100 mg/l Kanamycinsulfat. Sprosse bildeten sich nach 6-8 Wochen und wurden zur Wurzelbildung auf MS-Medium mit 250 mg/l Claforan und 150 mg/l Kanamycinsulfat umgesetzt.

### **Beispiel 3: Charakterisierung der erhaltenen transgenen Linien**

Die Expression des N-terminal modifizierten PLRV 17K TP wurde im Western blot mit Hilfe 17K-spezifischer Antiseren nachgewiesen wie in Tacke u.a., 1996 (op. cit.) beschrieben. Dazu wurden Proteinextrakte aus Blattmaterial hergestellt, die Proteine auf einem 12.5%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf Nitrozellulose- Membranen überführt und mit einem 17K-spezifischen Antikörper inkubiert. Der Nachweis gebundener Antikörper geschah nach bewährten Verfahren durch Inkubation mit Schaf-Anti-Kaninchen-IgG/Peroxidasekonjugat und dem Peroxidasesubstrat des ECL-Kits (Amersham).

### **Beispiel 4: Resistenztests mit *Phytophthora infestans***

Zur Ermittlung der quantitativen Resistenz wurden im Labor Befallstests mit dem Erreger der Kraut- und Knollenfäule, *Phytophthora infestans*, durchgeführt. Als Inokulum wurde die Rasse 1-11 des Pathogens verwendet (diese Rasse wird zur Erhaltung auf Blattmaterial der Kartoffelsorte Désirée kultiviert). Dazu wurden

---

Kartoffelblättchen in einer Bewässerungsbox (Gieffers, W., V.H. Paul und E. Ritter, 1989, Der Einfluß von Sauerstoff und UV-Licht auf die Konidienproduktion von *Pseudocercospora herpotrichoides* (Fron) Deighton, Merkmale zur Morphologie und dessen Nachweis an Dikotyledonen. J. Phytopathology **126**: 115-132), die eine permanente Wasserversorgung ermöglicht, mit dem Erreger inokuliert und unter 10°C ausgelegt. Die Lichtversorgung erfolgte mit 10 Röhren des Typs Osram, L16, W/25 Weiß Universal für 16 h täglich mit einer mittleren photoperiodisch aktiven Strahlung von ca. 100  $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ . Die nach 8-10 Tagen gebildeten Sporangien

wurden von den Blättchen mit Wasser abgespült. Der Anteil lebender Sporangien wurde mit der Färbemethode nach Behr (Behr, L., 1955: Eine neue Methode der Plasmafärbung von Pilzsporen mit Haematoxylin. Zentralblatt für Bakt. Etc. II 108: 23/24, 641-656) ermittelt. Für Befallstests wurde eine Suspension mit einer Sporangien-dichte von  $10^4 \text{ ml}^{-1}$  verwendet.

In Anlehnung an den Test nach Hodgson (Hodgson, W.A. (1961). Laboratory testing of the potato for resistance to *Phytophthora infestans*. American Potato Journal 38: 259-264) wurde ein neues Prüfverfahren entwickelt. Mittels einer für den Test entwickelten Stanze werden Blattscheiben von 20 mm Durchmesser hergestellt. Das Stanzverfahren arbeitet druckarm, so daß die Blattränder nicht gequetscht und Nekrosen sowie bakterielle Fäulen vermieden werden.

Die Blattscheiben werden in Bewässerungsboxen (Gieffers et al., op. cit.) auf Filterpapier mit der Unterseite nach oben ausgelegt. Der ständige Wasserfilm auf dem Filterpapier versorgt die Blattscheiben ausreichend mit Wasser. Zur Inokulation wird ein Tropfen mit einer Sporangien-suspension (200 Sporangien/20µl) auf die Blattscheibenmitte pipettiert.

Die inokulierten Blattscheiben werden unter einer Dauertemperatur von 10°C und den o.g. Lichtbedingungen inkubiert. Unter diesen Bedingungen schlüpfen die infektiösen Zoosporen. Nach ca. 6 Tagen werden die ersten Sporangien gebildet, die Befallsbonitur erfolgt nach 8 bis 10 Tagen.

Der Blattscheibenbefall, sichtbar durch Sporangienrasenbildung und Blattgewebezerfall, wird prozentual eingeschätzt.

Eine wichtige Voraussetzung für den Test besteht darin, daß die zu prüfenden Kartoffelpflanzen unter gleichen Bedingungen kultiviert und die Blattscheiben von Blättchen gleicher Blatttagen und gleicher Blattstellung gewonnen werden.

Auf diese Weise kann der quantitative Befall von Gewächshaus- wie Freilandmaterial geprüft werden. Die Befallshöhe entscheidet über den quantitativen Resistenzgrad.

### Beispiel 5: Induzierte Toleranz gegen Trockenheit als Beispiel für erhöhte Toleranz gegen abiotischen Stress

Jeweils 5 bzw. 6 Pflanzen der transgenen Linien L4, L6, L7 und L8 sowie die Ausgangssorte Linda wurden im 6-8Blatt-Stadium für 8 Wochen unter Trockenstress gehalten, wobei nach 3 und nach 6 Wochen die Pflanzen je einmal gewässert wurden. Die transgenen Pflanzen zeigten dabei in zwei unabhängigen Experimenten eine deutlich erhöhte Toleranz gegen Wasserstress, wie aus Tabelle 1 und den Figuren 3 und 4 hervorgeht.

Tabelle 1: Auswertung der Kartoffellinien L4, L6, L7 und L8 sowie der Ausgangssorte Linda nach 8 Wochen Wasserstress

Linie / Sorte # überlebende Pflanzen / # der untersuchten Pflanzen

	Exp. 1**	Exp. 2***
Linda	1*/5	1*/6
L4	4/5	6/6
L6	5/5	6/6
L7	5/5	6/6
L8	5/5	5/6

\* die überlebende Pflanze entwickelt aus der Knolle einen neuen Sproß; alle ursprünglichen Pflanzenteile sind tot im Gegensatz zu den überlebenden Pflanzen der transgenen Linien L4, L6, L7 und L8.

\*\* Dieser Versuch wurde unter kontrollierten Bedingungen im Gewächshaus durchgeführt.



\*\*\* Dieser Versuch wurde unter kontrollierten Bedingungen in einer Phytokammer durchgeführt.

**Beispiel 6: Induzierte Toleranz gegen *Phytophthora infestans* als Beispiel für erhöhte Toleranz gegen Pilzbefall**

Zwei unabhängige Befallsversuche mit *P. infestans* wurden mit den Rassen 1-11 auf Blattscheiben von Gewächshausmaterial durchgeführt. Dabei wurden von 8 Pflanzen pro transgene Linie und Ausgangssorte Linda je 8 Blattscheiben zur Infektion im Labortest verwendet. Das Inokulum enthielt 200 Sporangien pro 20 µl Wasser; die Inkubation der Blattscheiben erfolgte bei 10°C und Bonituren wurden nach 9, 10 und 13 Tagen nach der Infektion (dpi) vorgenommen. Alle 4 transgenen Linien zeigten gegenüber *P. infestans* bis 10 dpi signifikant geringeren Befall. Danach nahm der Befall bei L7 und L8 schnell zu, während L6 und besonders L4 weiterhin ihr relativ geringeres Befallsniveau beibehielten (Figur 5). Im Mittel beider Versuche ergibt sich ein signifikanter Unterschied im Resistenzverhalten der 4 getesteten transgenen Lindalinien im Vergleich zur nichttransgenen Ausgangssorte Linda (Figur 6).

## PATENTANSPRÜCHE

1. Verwendung einer Nukleinsäure, die ein (Poly)peptid mit einer intrinsischen Affinität zu Plasmodesmen kodiert, zur Erzeugung von Pflanzen oder Teilen davon mit erhöhter Toleranz gegen Trockenheit und/oder Pilzinfektionen und/oder erhöhte Salzkonzentrationen.
2. Verwendung nach Anspruch 1, wobei ferner eine Pflanze aus der transfizierten Pflanzenzelle regeneriert wird.
3. Verwendung nach Anspruch 2, wobei, im Anschluß an die Regeneration, ferner weitere Pflanzen oder Pflanzenzellen aus der regenerierten Pflanze erzeugt werden.
4. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei das (Poly)peptid ein Virus-kodiertes Transportprotein ist.
5. Verwendung nach Anspruch 4, wobei das Virus-kodierte Transportprotein das Kartoffelblattrollvirus-(PLRV) Transportprotein pr17 oder ein Derivat davon ist.
6. Verwendung nach Anspruch 5, wobei das Derivat ein pr17-Protein mit einer hydrophilen N-terminalen Verlängerung ist.
- ~~7. Verwendung nach Anspruch 6, wobei die hydrophile Verlängerung die Aminosäure MAELSGSGSELHRGGGRSRTS ist.~~
8. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei die Pflanze, das Pflanzengewebe oder die Pflanzenzellen aus der Kartoffel, aus Tabak, aus Getreide oder Gemüse stammen bzw. Kartoffeln, Tabakpflanzen, Getreidepflanzen bzw. Gemüsepflanzen sind.

9. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei die Erhöhung der Toleranz von Pflanzen gegen Pilzinfektionen eine Erhöhung der Toleranz gegen Infektionen mit *Phytophthora infestans* ist.
10. Verfahren zur Erzeugung von Pflanzen oder Teilen davon mit erhöhter Toleranz gegen Trockenheit und/oder Pilzinfektionen und/oder erhöhte Salzkonzentrationen, wobei man
  - (a) eine Pflanze, ein Pflanzengewebe oder eine Pflanzenzelle mit einer Nukleinsäure transfiziert, die ein (Poly)peptid mit einer intrinsischen Affinität zu Plasmodesmen kodiert.
11. Verfahren nach Anspruch 10, wobei man ferner
  - (b) eine Pflanze aus der transfizierten Pflanzenzelle regeneriert.
12. Verfahren nach Anspruch 11, wobei man, im Anschluß an Schritt (b) ferner
  - (c) weitere Pflanzen oder Pflanzenzellen aus der in (b) gewonnenen Pflanze erzeugt.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 12, wobei das (Poly)peptid ein Virus-kodiertes Transportprotein ist.
14. Verfahren nach Anspruch 13, wobei das Virus-kodierte Transportprotein das Kartoffelblattrollvirus-(PLRV) Transportprotein pr17 oder ein Derivat davon ist.
15. ~~Verfahren nach Anspruch 14, wobei das Derivat ein pr17-Protein mit einer hydrophilen N-terminalen Verlängerung ist.~~
16. Verfahren nach Anspruch 15, wobei die hydrophile Verlängerung die Aminosäure MAELSGSGSELHRGGGRSRTS ist.
17. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 16, wobei die Pflanze, das Pflanzengewebe oder die Pflanzenzellen aus der Kartoffel, aus Tabak, aus

Getreide oder Gemüse stammen bzw. Kartoffeln, Tabakpflanzen, Getreidepflanzen oder Gemüsepflanzen sind.

18. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 17, wobei die Erhöhung der Toleranz von Pflanzen gegen Pilzinfektionen eine Erhöhung der Toleranz gegen Infektionen mit *Phytophthora infestans* ist.

### **Zusammenfassung**

Die Erfindung betrifft die Verwendung von Nukleinsäuren, die ein (Poly)peptid mit einer intrinsischen Affinität zu Plasmodesmen kodieren, zur Erzeugung von Pflanzen oder Teilen davon mit erhöhter Toleranz gegen Trockenheit und/oder Pilzinfektionen und/oder erhöhten Salzkonzentrationen sowie entsprechende Verfahren. Vorteilhafterweise transfiziert man dabei eine Pflanze, ein Pflanzengewebe oder eine Pflanzenzelle mit der Nukleinsäure. Vorzugsweise kodiert die Nukleinsäure ein Virus-kodiertes Transportprotein, das in einer besonders bevorzugten Ausführungsform ein Derivat des pr17-Proteins mit einer hydrophilen N-terminalen Verlängerung ist.

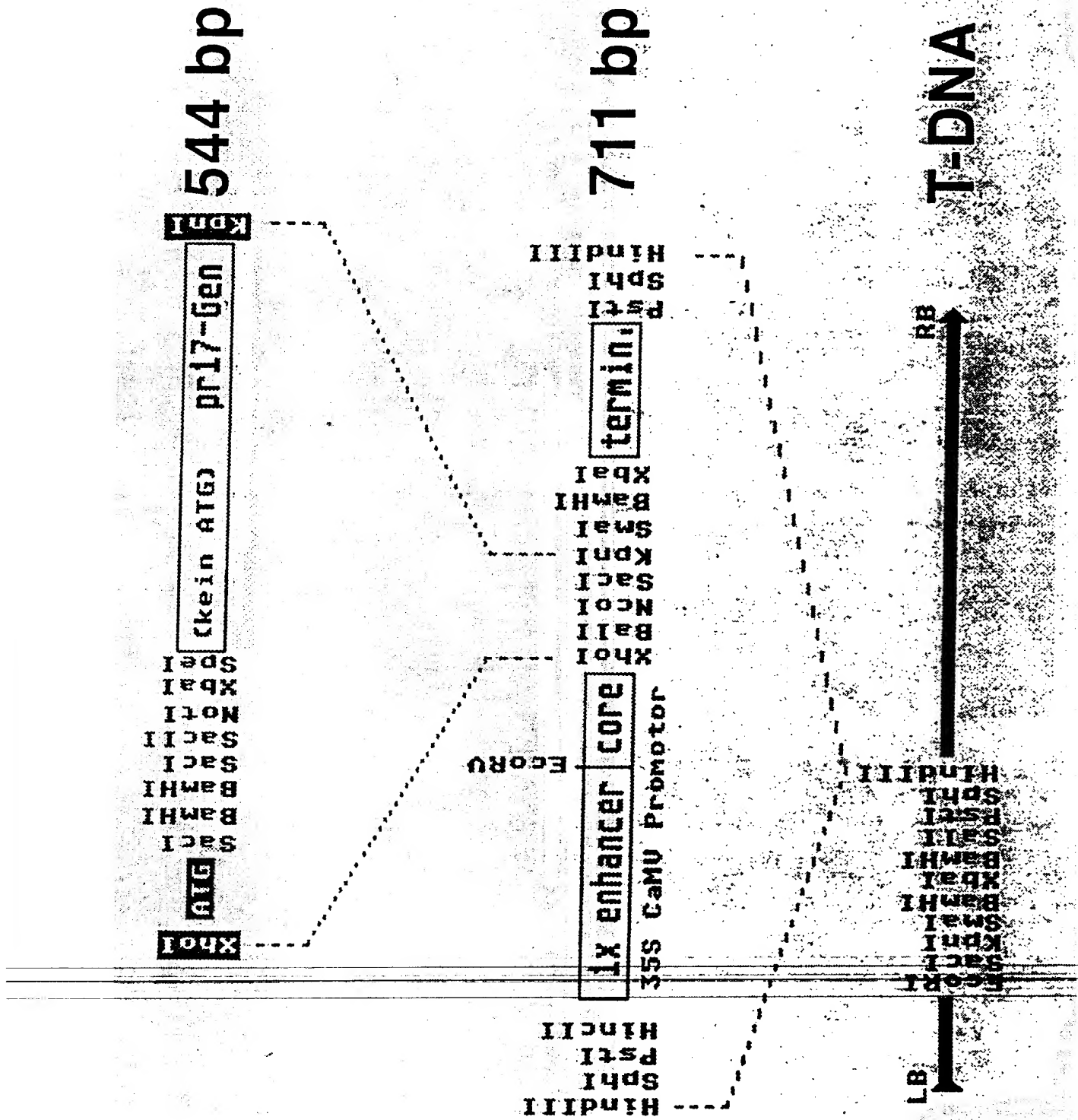


Fig. 1



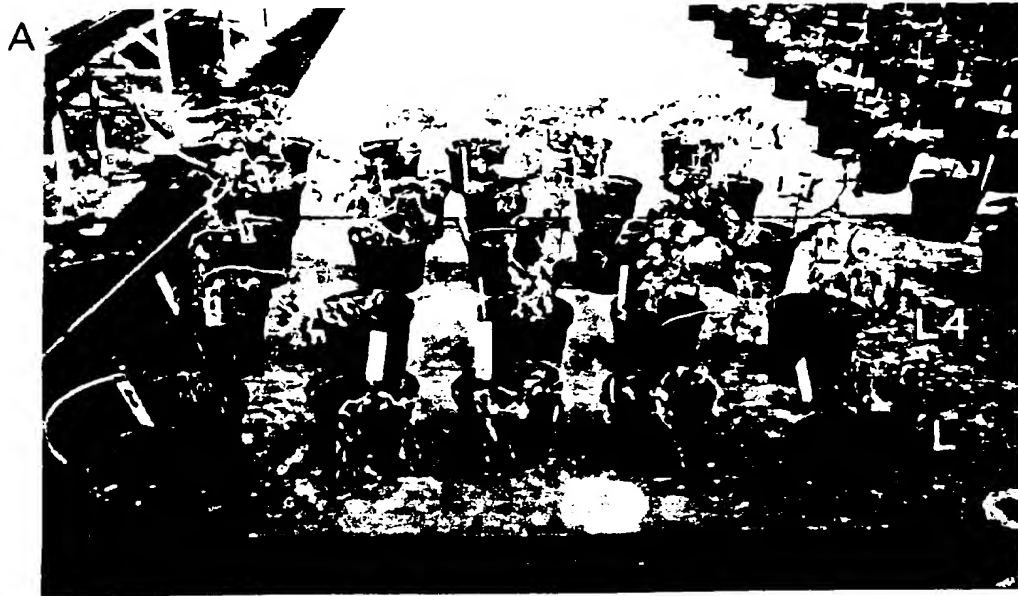
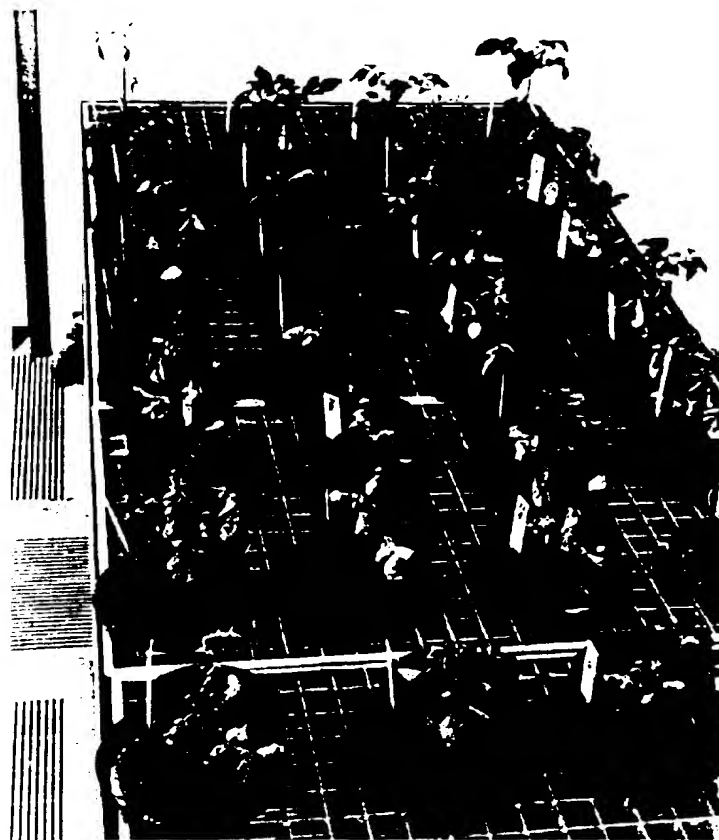


Fig. 3



A



B

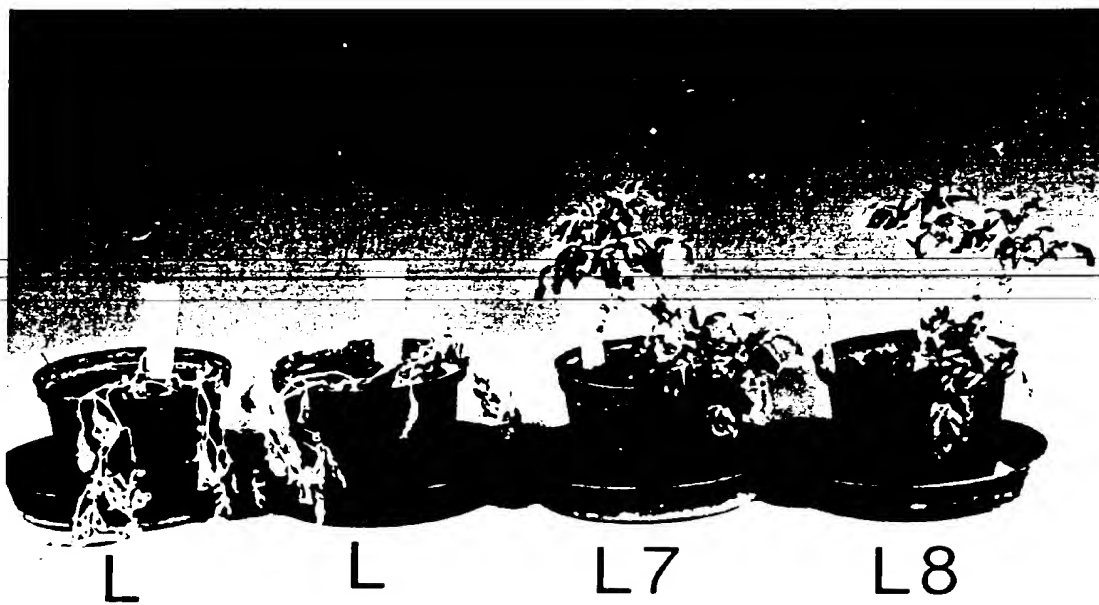
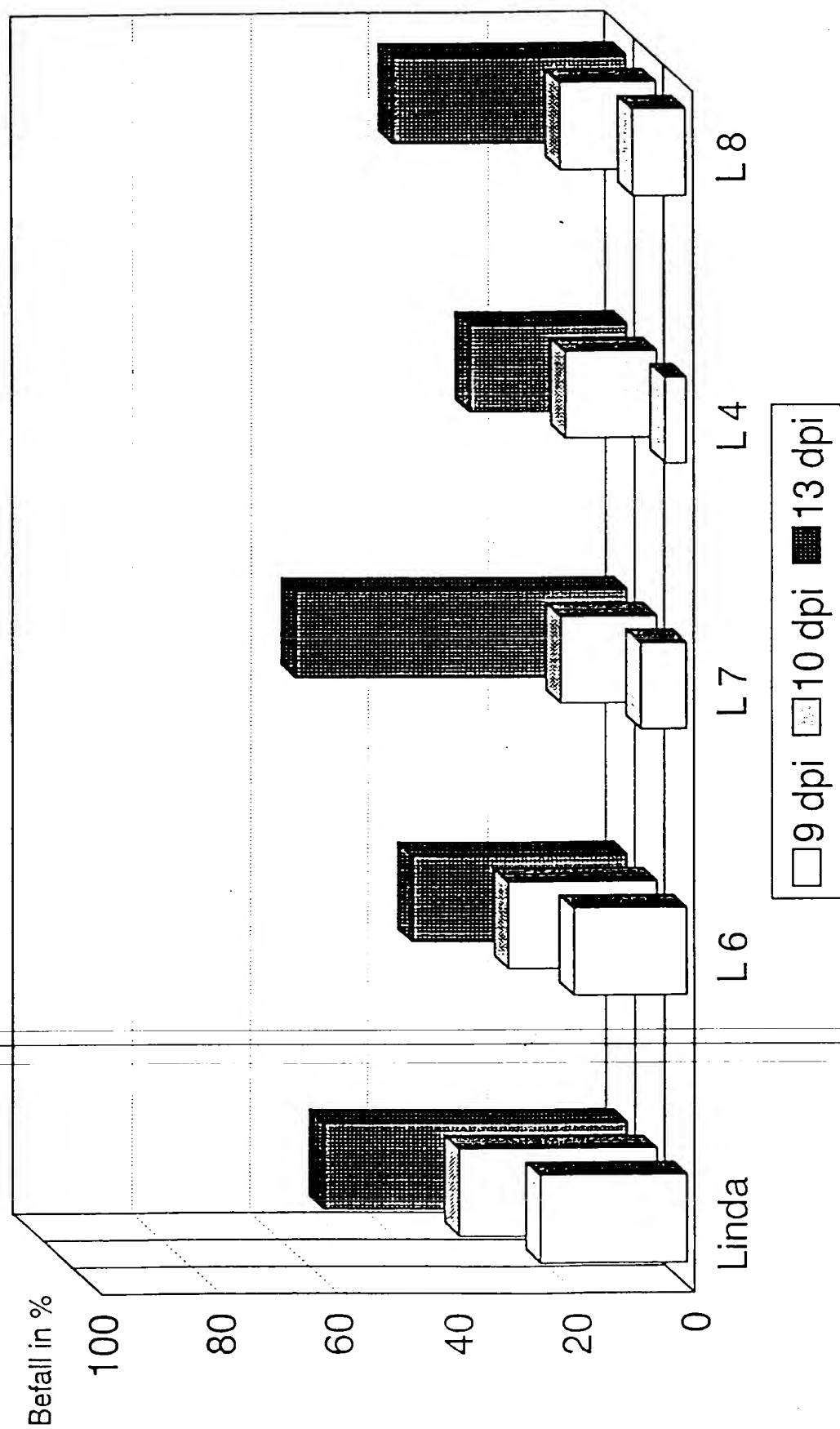


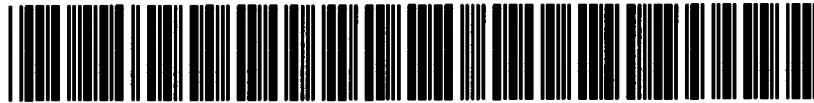
Fig. 4

# Phytophthora infestans-Befall auf Linda u.a.

Laborfest, R 1-11



US 0970034905P1



Creation date: 29-08-2003  
Indexing Officer: MJOHNSON - MOZELLE JOHNSON  
Team: OIPEBackFileIndexing  
Dossier: 09700349

Legal Date: 06-06-2002

No.	Doccode	Number of pages
1	CTMS	4

Total number of pages: 4

Remarks:

Order of re-scan issued on .....